

**NALAZ *ESCHERICHIA COLI* I ENTEROKOKA U SIREVIMA
PROIZVEDENIM U DOMAĆINSTVU***
***FINDINGS OF ESCHERICHIA COLI AND ENTEROCOCCUS SPP. IN
HOMEMADE CHEESE***

Z. Tambur, Dolores Opačić, R. Doder, M. Marković**

Za sireve koji se proizvode u domaćinstvu nema podataka koliko je to higijenska proizvodnja i hteli smo da ispitamo ove dve grupe bakterija kao indikatora higijene u proizvodnji sireva proizvedih u domaćinstvu.

*U periodu od februara do marta 2004. godine mikrobiološki je ispitano 108 uzoraka sira proizvedenog u domaćinstvu, sa pijaca iz Pančeva, Subotice i Beograda. Izolovanje *Escherichia coli* je rađena metodom opisanom u Pravilniku o metodama vršenja mikrobioloških analiza i superanaliza životnih namirnica (SI list SFRJ 25/80). Izolovanje *Enterococcus* vrsta u namirnicama je izvođeno na dekstroznom teluritnom agaru.*

*Iz 108 uzoraka mladog sira sa područja Pančeva, Beograda i Subotice izolovani su: *Enterococcus spp.* iz 96%, *Escherichia coli* iz 69% uzoraka sira.*

*Ni iz jednog uzorka sira nije izolovana verocitotoksična *Escherichia coli*.*

*Ključne reči: sir, *Enterococcus*, *Escherichia coli**

Uvod / Introduction

Sir, koji se tradicionalno ne proizvodi u domaćinstvu u pravilu se proizvodi od sirovog mleka, pa može da sadrži mikroorganizme poreklom iz vimena ili mikroorganizme iz okoline [1, 2, 15, 16].

Poslednjih godina, verocitotoksin/Shiga toksin produkujući *E. coli* (VTEC/STEC) pojavljuju se kao značajan uzročnik alimentarnih oboljenja ljudi-

* Rad primljen za štampu 13. 4. 2007. godine

** Mr sc. vet. med. Zoran Tambur, Institut za higijenu, VMA, Beograd; mr sc. biol. Dolores Opačić, Institut za epidemiologiju, VMA, Beograd; doc. dr sc. med. Radoje Doder, Klinika za gastroenterologiju, VMA, Beograd; Miroslav Marković, vet. spec., Institut za toksikologiju i farmakologiju, Centar za kontrolu trovanja, VMA, Beograd

uzročnik dijareja, hemoragičnog kolitisa i hemolitičko uremijskog sindroma [5]. Glavni izvor kontaminacije mleka su goveda, međutim, sojevi verocitotoksin/Shiga toksin produkujuići *E. coli* dokazani su i kod ovaca, koza, a sporadično kod živine i svinja [7]. Infekcija ljudi ovim mikroorganizmima dovode se u vezu kada oni jedu kontaminiranu hranu i vodu, termički nedovoljno obrađenu hranu životinjskog porekla i nepasterizovanog mleka [12]. Neki autori su ustanovili prisustvo verocitotoksičnosti *E. coli* u siru proizvedenom u domaćinstvu [6].

Faktori virulencije koji doprinose patogenezi obuhvataju:

– stvaranje jednog ili oba fagom kodirana verocitotoksina (VT1 i VT2), koji inhibiranjem proteinske sinteze izazivaju smrt enterocita, endotelnih ćelija malih krvnih sudova creva, bubrega, mozga i ostalih ćelija koje poseduju Gb3 (globotrizaoil) receptor, a *in vitro* smrt Vero i HeLa ćelija;

– adhezin intimin kojim je omogućena intimna adherencija za enterocite;

– enterohemolizin [11].

Opisano je trovanje sirom u kome je pronađena enterotoksigena *Escherichia coli* O27:H20 [9]. Fantasia i sar. [4] izveštavaju o nalazu enteropatogenih *E. coli* u siru. Najčešće izolovan soj O124:B17 ne fermentuje laktozu unutar 48 časova. Od pregledanih uzoraka više od 10% izolata je pripadalo serološkim grupama koje izazivaju dijarealna oboljenja. U siru od nepasterizovanog mleka Quinto i sar [15] ustanovili su prisustvo ETEC, VTEC i NTEC.

Budući da Pravilnikom [14] nije predviđeno ispitivanje sira na prisustvo verocitotoksin/Shiga toksin produkujuićih *Escherichia coli*, a imajući u vidu aktuelnost ovih patogena koji se hranom prenose na ljude, cilj ovog rada je bio da se ispita kontaminacija sira sa *Escherichia coli* i u slučaju nalaza ovog mikroorganizma utvrdi eventualno prisustvo verocitotoksičnih (VTEC) sojeva.

Materijal i metode / Materials and methods

U periodu od februara do marta 2004. godine mikrobiološki je ispitano 108 uzoraka sira iz domaćinstva, koji potiče sa pijaca iz Pančeva, Subotice i Beograda.

Za izolovanje i identifikaciju *Escherichia coli* iz razređenja 1:100 zasejan je 1 ml u epruvetu sa brilijant-zelenim laktoza žučnim bujonom sa Durhamovom cevčicom. Podloga je inkubirana 24 do 48 časova na 44°C. Iz brilijant-zelenih laktoza žučnih bujona u kojima je došlo do stvaranje gasa u Durhamovim cevčicama posle 24 ili 48 časova jedna omčica materijala je presejana na površinu ljubičasto-crvenog žučnog agara. Karakteristične kolonije izrasle na ljubičasto-crvenog žučnog agara posle inkubacije od 24 časa na 44°C su presejane na kosi hranljivi agar. Za dalju identifikaciju sa hranljivog agara je rađen kratki biohemijski niz (IMVC) i zasejavano na površinu Chromo agara.

Enterokoke su izolovane zasejavanjem decimalnog razblaženja sira na površinu podloge sa kalijumteluritom (dekstrozni teluritni agar). Zasejane pod-

loge su inkubirane 24-48 časova na temperaturi od 37°C. Na podlozi sa kalijum teluritom *Enterococcus spp.* obrazuje sitne crne kolonije. Na mikroskopskom preparatu po Gramu vide se kao gram-pozitivne loptaste bakterije, pojedinačno, u parovima ili lancima. *Enterococcus* je identifikovan do nivoa roda na osnovu fermentacije eskulina i negativnog katalaza testa.

Dokazivanje verocitotoksina rađeno je na Vero kulturi tkiva [6]. Kultura Vero ćelija je nakon formiranja kontinualnog sloja tripsinizirana i resuspendovana u 5 ml Medium-a 199 sa 10% goveđeg seruma. Od toga je 2 ml dodato u 20 ml istog medijuma, a po 0.2 ml je sipano u svako okno sistema za minikulture. Sistemi minikultura su inkubirani 24 časa na temperaturi od 37°C uz 5% CO₂ do formiranja konfluentnog sloja. Ispitivani sojevi su zasejavani u 10 ml LB medijuma i inkubirani 24 časa na temperaturi od 37°C. Zatim je obavljeno centrifugovanje (3000 rpm/30 min), a supernatant odvajani i korišćen za ispitivanje verocitotoksina. U 2 ml supernatanta dodat je gentamicin krajnje koncentracije 80 µg/ml. U svako okno sistema minikultura, dodato je po 0,05 ml ispitivanog supernatanta. Inkubacija je produžena naredna 72h. Nakon inkubacije obavljeno je ispiranje, fiksiranje metanolom i bojenje tkiva 5%-nim rastvorom po Giemsu. Ukoliko je mikroskopskim pregledom utvrđena promena izgleda većine ćelija kulture tkiva i redukcija njihovog broja za najmanje 50%, smatrano je da ispitivani soj stvara verocitotoksin. Kao pozitivna kontrola korišćen je verocitotoksičan soj *E.coli* O157:H7.

Rezultati rada i diskusija / *Results and discussion*

Rezultati rada mikrobiološkog ispitivanja uzoraka mladog sira sa područja Pančeva, Subotice i Beograda su prikazali u tabeli 1.

Tabela 1. *Mikroorganizmi izolovani iz sira proizvedenom u domaćinstvu / Table 1. Microorganisms isolated from soft cheese in homemade*

Vrsta mikroorganizma / <i>Specie of microorganism</i>	Broj ispitanih uzoraka / <i>Number of examined samples</i>	Izolovani mikroorganizmi / <i>Isolated microorganisms</i>	
		Broj / <i>Number</i>	%
<i>Enterococcus spp.</i>	108	104	96,00
<i>Escherichia coli</i>	108	69	63,89

Od 108 pregledanih uzoraka sira ispitivani mikroorganizmi su izolovani iz 104 uzorka. *Enterococcus spp.* je izolovan iz 104 uzorka ispitivanih sireva. Naši rezultati su saglasni rezultatima drugih autora [8, 16]. *Escherichia coli* je izolovana iz 69 ispitivanih uzoraka mladog sira. Najmanji procenat kontaminacije po regionima bio je u Subotici (48,72%). Naši rezultati su saglasni sa rezultatima ispitivanja drugih autora [1, 2, 8]. Ispitivanjem 69 sojeva *E.coli*, izolovanih iz sireva, nije registrovan verocitotoksičan efekat. Naši rezultati se slažu sa atorima Vivegnis i sar. koji nisu izolovali *E.coli* O157:H7 iz 69 uzoraka mekih i polu-mekih

sireva i zaključuju da su ispitivani sirevi napravljeni od pasterizovanog mleka [17]. Nasuprot ovim podacima, Dontorou *et al* [3] utvrdili su prisustvo verocitotoksina (*E.coli* O157) u 1 od 100 (1%) uzoraka nepasterizovanog ovčijeg mleka, dok Quinto and Cepeda [15] ispitivanjem mekih sireva (n=221) napravljenih od nepasterizovanog kravljeg mleka otkrivaju 1 (0.4%) verocitotoksičan soj. Soj je pripadao serogrubi O2, koja se vezuje za nekoliko slučajeva HUS-a. U epidemiji prouzrokovanoj konzumiranjem nepasterizovanog mleka, kod predškolske dece je izolovana VTEC O157:H7, dok je kod 3 (7%) došlo do razvoja HUS-a [15]. Iako kod ovih sojeva nisu utvrđeni dodatni faktori virulencije koji bi izazvali oboljenje, sireve koji su napravljeni od nepasterizovanog mleka trebalo bi smatrati rizičnim zbog sposobnosti VTEC sojeva da prežive u različitim uslovima [17].

Zaključak / Conclusion

Iz 108 uzoraka sira iz domaćinstva uzorkovanih na pijaci u Pančevu, Beogradu i Subotici izolovani su: *Enterococcus* spp. iz 96%, *Escherichia coli* iz 69%. Verocitotoksična *Escherichia coli* nije dokazana kod izolovanih sojeva.

Literatura / References

1. Ansary S. E., Kaspar C. W.: Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for *Escherichia coli* O157:H7, Lett. Appl. Microbiol., 25, 2, 131-134, 1997.
2. Araujo V. S., Pagliares V. A., Queiroz M. L., Freitas-Almeida A. C.: Occurrence of Staphylococcus and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil, J. Appl. Microbiol., 92, 6, 1172-1177, 2002.
3. Dontorou C., Papadopoulou C., Filioussis G., Economou V., Apostolou I., Zakkas G., Salamoura A., Kansouzidou A., Levitidou S.: Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 From Foods In Greece. International Journal of Food Microbiology 82, 3, 273-279, 2003.
4. Fantasia L. D., Mestrandrea L., Schrade J. P., Yager J.: Detection and growth of enteropathogenic *Escherichia coli* in soft ripened cheese. Applied Microbiology, 179-185, 1975.
5. Heuvelink A. E., van den Biggelaar F. L. A. M., Zwartkruis-Nahuis J. T. M., Herbes R. G., Huyben R., Nagelkerke N., Melchers W. J. G., Monnens L. A. H., de Boer E.: Occurrence of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 on Dutch Dairy Farms. Journal of Clinical Microbiology, 3480-3487, 1998.
6. Karmali M. A.: Laboratory Diagnosis of Verotoxin-Producing *E. coli* Infections. Clin Microbiol Newsletter, 9, 9, 65-70, 1987.
7. Keskimaki M., Saari M., Heiskanen T., Siitonen A.: Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Finland from 1990 through 1997: Prevalence and Characteristics of Isolates. Journal of Clinical Microbiology, 3641-3646, 1998.
8. Laukova A., Czikkova S.: Antagonistic effect of enterocin CCM 4231 from *Enterococcus faecium* on „bryndza”, a traditional Slovak dairy product from sheep milk, Microbiol Res., 156, 1, 31-4, 2001.
9. Marier R., Wells J. G., Swanson R. C., Callahan W., Mehlman I. J.: Update: gastrointestinal illness associated with imported semi-soft cheese, MMWR Weekly, January 20, 33, 2, 16, 22, 1984.
10. Marija Škrinjar: Metode mikrobiološke kontrole životnih namirnica, Novi Sad, 1994. strana 150-151.
11. Nataro J. P., Kasper J. B.: Diarrheagenic *E. coli*. Clin. Microbiol. Rev., 11, 144-186, 1988.
12. Pradel N., Livrelli V., de Champs C., Palcoux J. B., Reynaud A., Scheutz F., Sirot J., Joly B., Forestier C.: Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle, Food and Children during a One-Year Prospective Study in France. Journal of Clinical Microbiology, 1023-1031, 2000.
13. Pravilnik o metodama vršenja mikrobioloških analiza i superanaliza životnih namirnica,

SI.list SFRJ 25/80. - 14. Pravilnik o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu, SI.list SRJ 26/93. - 15. Quinto E. J. Cepeda A.: Incidence of Toxigenic *Escherichia coli* In Soft Cheese Made With Raw or Pasteurized Milk. Letters in Applied Microbiology, 24, 291-295, 1997. - 16. Reinheimer J. A., Binetti A. G., Quiberoni A., Bailo N. B., Rubiolo A. C., Giraffa G.: Natural milk cultures for the production of Argentinian cheeses, J.Food.Prot.,Jan. 60, 1, 59-63, 1997. - 17. Vivegnis J., El Lioui M., Leclercq A., Lambert B., Decallonne J.: Detection of Shiga -Like Toxin Producing *Escherichia coli* From Raw Milk Cheeses Produced in Wallonia. Biotechnol Agron Soc Environ, 3, 3, 159-164, 1999.

ENGLISH

FINDINGS OF *ESCHERICHIA COLI* AND *ENTEROCOCCUS SPP.* IN HOMEMADE CHEESE

Z. Tambur, Dolores Opacic, R. Doder, M. Marković

During the period from February until March 2004, 108 samples of soft cheese originating from markets of Pancevo, Subotica and Belgrade were examined. Microbiological analyses of the cheese samples to the presence of *Escherichia coli* was performed using methods described in the Regulations on methods for performing microbiological analyses and superanalyses of consumer articles, while the presence of bacteria *Enterococcus spp.* was performed on the dexter agar. From 108 samples of soft cheese from the territories of Pancevo, Belgrade and Subotica were isolated: *Enterococcus spp.* from 96% and *Escherichia coli* from 69%, cheese samples.

Verocytotoxic *E.coli* was not isolated from any of the taken cheese samples.

Key words: cheese, *Enterococcus*, *Escherichia coli*

РУССКИЙ

РЕЗУЛЬТАТЫ *ESCHERICHIA COLI* И ЭНТЕРОКОККОВ В СЫРАХ ПРОИЗВЕДЁННЫМ В ХОЗЯЙСТВЕ

З. Тамбур, Долорес Опачич, Р. Додер, М. Маркович

В периоде от февраля до марта 2004 года микробиологически испытано нами 108 образчиков молодого сыра, в происхождение с базаров из Панчева, Суботицы и Белграда. Микробиологический анализ образчиков сыра на присутствие Сальмонелл видов, коагуляза положительных стафилококков, сульфиторедуцирующих клостридий, *Proteus* видов и *Escherichia coli* делана методами, описанными в Регламенте о методах совершения микробиологических анализов и суперанализов продуктов питания. Из 108 образчиков молодого сыра с района Панчева, Белграда и Суботицы изолированы: *Enterococcus spp.* из 96%, *Escherichia coli* из 69%, из образчиков сыра.

Ни из одного образчика сыра не изолирована веротодсическая *E. coli*.

Ключевые слова: сыр, *Enterococcus*, *Escherichia coli*